

University of Groningen

Bioconversions catalyzed by growing immobilized bacteria

van Ede, Cornelis Jacobus

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1994

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

van Ede, C. J. (1994). *Bioconversions catalyzed by growing immobilized bacteria: analytical models describing diffusion and reaction in substrate or product inhibited biofilms*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting[#]

Bioconversies gekatalyseerd door groeiende, geïmmobiliseerde bacteriën

Analytische modellen die diffusie en reactie in biofilms beschrijven, waarvan de groei door een substraat of door een produkt geremd wordt.

Al heel lang worden micro-organismen door de mens gebruikt voor biotechnologische toepassingen, denk maar aan de produktie van wijn, bier, kaas, yoghurt en brood. In de tweede helft van deze eeuw zijn de mogelijkheden enorm verruimd. Men heeft geleidelijk door gekregen dat (delen van) cellen van dierlijke of plantaardige oorsprong niet alleen veel nuttige stoffen kunnen produceren, maar ook talloze schadelijke (milieu verontreinigende) stoffen kunnen afbreken.

Dit proefschrift gaat vooral over de (mogelijke) toepassingen van groeiende bacteriën, ééncellige beestjes met een diameter van ongeveer 1/1000 mm.

Het vakgebied der bioprocestechnologie, waarbinnen het hier beschreven onderzoek valt, stelt zich tot doel de apparaten (de zg. 'reactoren') waarin de bacteriën uiteindelijk moeten gaan doen wat wij willen, te ontwerpen, te begrijpen en te optimaliseren.

In zijn simpelste vorm is zo'n reactor een geroerd vat gevuld met medium (dat is water met daarin voor bacteriegroei noodzakelijke voedingsstoffen) waarin de bacteriën vrij mogen rondzwemmen.

Tegenwoordig kiest men er echter steeds vaker voor om de bacteriën in plaats hiervan te immobiliseren (vast te zetten) in of rond deeltjes die aan het medium worden toegevoegd. Hierdoor is het bijvoorbeeld makkelijker om later een gewenst produkt van de bacteriën te scheiden.

Figuur 1 laat bacteriën zien die, geïmmobiliseerd rond een zandkorrel, een zogenaamde biofilm vormen. Dit is een min of meer homogene laag bacteriën, die aan elkaar én aan de zandkorrel hechten. De hiervoor benodigde hechtingseigenschappen bezitten de meeste bacteriën van nature, dit verzekert o.a. uw tandarts van zijn/haar inkomen (tandplak!).

[#] Deze samenvatting is geschreven voor de geïnteresseerde leek.
Bioprocestechnologieën worden verwezen naar de Engelstalige samenvatting.

Stel nu dat we met deze zandkorrel met biofilm, kortweg **biokatalysator** genoemd, bv. glucose (een bestanddeel van suiker dat tevens de bacteriën voedt) willen omzetten in alcohol (het produkt), dan is de bioprocestechnoloog voornamelijk in het volgende geïnteresseerd:

- 1: Hoeveel bacteriën zijn er (m.a.w. wat is de **biofilmdikte**) en hoe hard groeien ze?. Deze twee bepalen samen de **produktiviteit** van de biokatalysator, omdat de alcoholproductie min of meer aan de groeisnelheid gekoppeld is.
- 2: Hoeveel % van het gebruikte glucose wordt daadwerkelijk omgezet in alcohol en hoeveel % wordt verbruikt (gaat verloren) voor de bacteriegroei? (dit is de **selectiviteit** van het proces)
- 3: Hoe kan ik de produktiviteit en/of selectiviteit verbeteren?.

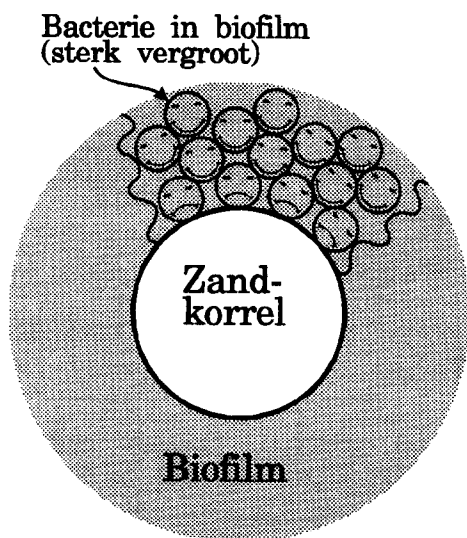
Zoals te zien op figuur 1, kijken de bacteriën aan de binnenkant van de biofilm niet bijster opgewekt. Dit heeft de volgende oorzaak:

Dieper in de biofilm daalt de glucose concentratie door de consumptie en de omzetting in alcohol, terwijl de alcoholconcentratie juist stijgt. Dit betekent dat de bacteriën dus steeds minder voedsel krijgen en steeds meer aan het **giftige produkt** (alcohol) blootgesteld worden, zie figuur 2, en daar zijn ze niet blij mee!.

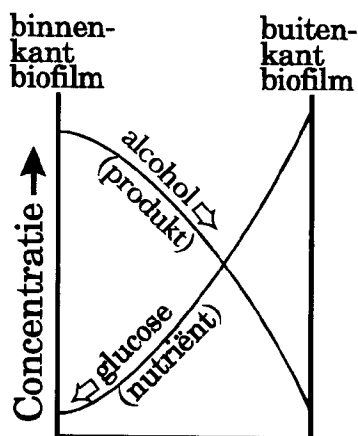
Omdat de bacteriën bijna even hard groeien met weinig glucose als met veel, wordt de groeisnelheid in de biofilm hoofdzakelijk bepaald door de alcoholconcentratie. Alcohol is dus de **groeisnelheids-bepalende stof**.

Helemaal zonder glucose wordt de groeisnelheid echter wel plotseling nul! (Een "alles of niets" principe). Daarom wordt, afhankelijk van de omstandigheden rond de biofilm, de biofilmdikte óf door de alcoholafvoer óf door de glucoseaanvoer beperkt:

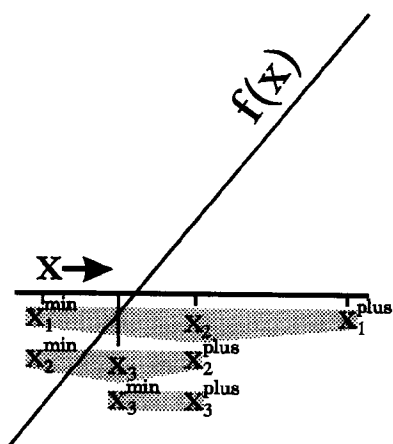
- 1: Als door teveel alcohol de bacteriegroei aan de binnenzijde van de biofilm stopt, dan is alcohol de **biofilm-dikte-bepalende stof**.
- 2: Als door te weinig glucose de bacteriegroei aan de binnenzijde van de biofilm stopt, dan is glucose de **biofilm-dikte-bepalende stof**.



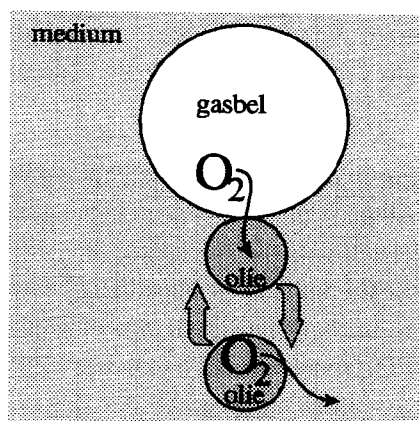
Figuur 1. Dwarsdoorsnede van een biokatalysator.



Figuur 2. Concentraties in biofilm (\Rightarrow = transport richting).



Figuur 3. Numerieke nulpuntsbepaling van $f(x) = ax - b$



Figuur 4. Principe versnelling zuurstoftransport door oliedruppels.

In werkelijkheid hebben we veel meer nutriënten en produkten dan twee (hier glucose en alcohol). Toch is het hier beschreven voorbeeld wel realistisch, omdat het gedrag van een willekeurige biokatalysator inderdaad vaak door slechts twee van al die stoffen wordt beïnvloed:

- I. Een giftig produkt of een giftig nutriënt (denk aan afvalwaterzuivering) dat **groeisnelheids-bepalend** is.
- II. Een nutriënt of giftig produkt dat **biofilm-dikte-bepalend** is.

In dit proefschrift worden, gebruik makend van dit gegeven, oplossingen voor de produktiviteit en de biofilmdikte van de biokatalysator, als functie van **kengetallen** (ϕ 's) gegeven.

Deze kengetallen, die veelvuldig in het proefschrift gebruikt worden, zijn geen 'vreselijke formules', maar zijn getallen die o.a. de omstandigheden rond de katalysator weergeven, bijvoorbeeld de concentraties van nutriënten en produkten, zodat we kunnen voorspellen wat de katalysator gaat doen als we hem onder bepaalde omstandigheden gaan toepassen.

Bovengenoemde oplossingen bestonden eigenlijk al, maar die zijn **numeriek**, terwijl de oplossingen in dit proefschrift **analytisch** zijn. Om het voordeel van zo'n analytische oplossing te begrijpen, het volgende voorbeeld: De functie $f(x) = ax - b$ hangt van de omstandigheden (vergelijk kengetallen) a en b af. Gevraagd wordt op te lossen:

$$f(x) = ax - b = 0$$

Marietje geeft als analytische oplossing: $x = b/a$.

Jantje heeft nooit wiskunde gehad, maar is wel in staat om $f(x)$ in te voeren in een computer en dit apparaat op te dragen een oplossing te zoeken via een rekenpartij (numeriek=getalsmatig).

Zo'n computer start bijvoorbeeld met twee waarden voor x , x_1^{\min} en x_1^{plus} , waartussen de oplossing in ieder geval ligt, zie figuur 3, en probeert vervolgens $x_2 = (x_1^{\min} + x_1^{\text{plus}})/2$. Omdat $f(x_2)$ groter dan nul is en $f(x_1^{\min})$ kleiner dan nul, 'weet' de computer dat de oplossing ook in het kleinere interval tussen $x_2^{\min} = x_1^{\min}$ en $x_2^{\text{plus}} = x_2$ moet liggen. Door deze procedure, uitgaande van dit nieuwe interval te herhalen (het eerstvolgende interval is nog in figuur 3 aangegeven), kan de oplossing met elke gewenste nauwkeurigheid benaderd worden.

Vervolgens vragen we aan Jantje en Marietje: Wat moet ik aan de omstandigheden a en b doen om een grotere x als oplossing van $f(x)=0$ te verkrijgen? (vergelijk: om een dikkere biofilm te verkrijgen)

Marietje, die inmiddels een blokje om was gegaan, zegt direct: b groter maken of a kleiner, dat kan ik aan mijn oplossing zien! (vergelijk: de concentratie van een nutriënt rondom de biofilm verhogen).

Jantje zegt echter: Ik moet eerst een heleboel a en b waarden proberen, momentje....

De moraal van dit verhaal: Een analytische oplossing werkt veel sneller en vergroot het inzicht. Aan de andere kant is er voor veel problemen als de analytische aanpak faalt nog wél een numerieke oplossing. Daarom gebruikten we zo'n numerieke oplossing om vast te stellen wanneer precies de aanname van een 'alles of niets'- principe voor de invloed van de nutriënten op de groeisnelheid, nodig voor het verkrijgen van de analytische oplossingen, gerechtvaardigd is.

Willen we met een biokatalysator een giftige stof produceren, dan is het belangrijk de concentratie hiervan in het medium zo klein mogelijk te houden, zodat de groei- en de hieraan gekoppelde produktesnelheid op peil blijven.

Met dit gegeven in het achterhoofd werd een nieuw type reactor, de '3+1 Fase - Reactor', door ons ontworpen en vervolgens gebruikt om giftig epoxide uit octeen te maken met biofilms van *Pseudomonas oleovorans* (= in bodem levende olieverslinder).

In figuur 4 van hoofdstuk 5 (blz 135) is de eigenlijke bioreactor aangegeven met nummer 2. In deze min of meer ronde buis bevindt zich medium, met daarin de biokatalysator. De inhoud van deze zogenaamde air-lift reactor wordt goed gemengd door opstijgende gasbellen.

In serie met deze bioreactor staat een zuil gevuld met olie en opstijgende gasbellen, de bellenzuil. De olie bestaat aanvankelijk alleen uit octeen, maar blijkt later vrijwel al het gevormde produkt te bevatten!

Het grootste deel van het gas wordt namelijk continu rondgepompt van bellenzuil naar bioreactor en vice versa. (een klein deel wordt continu ververst om de bacteriën van zuurstof te voorzien).

Hierbij neemt dit gas voortdurend octeen mee van bellenzuil naar de bioreactor, en neemt gevormd produkt weer mee terug. Omdat epoxide veel beter oplost in olie dan in medium komt zo het grootste deel van het produkt in de bellenzuil terecht, en krijgt dus weinig kans zijn giftige invloed op de biofilms uit te oefenen. Een bijkomend voordeel van deze opstelling is, dat je het produkt alleen nog van het octeen hoeft te scheiden om het gezuiverd in handen te krijgen.

Als laatste deel van het onderzoek werd gekeken naar een andere nuttige eigenschap van de octeen-olie die *Pseudomonas oleovorans* als nutriënt gebruikt.

Het was al bekend dat het verdelen van kleine oliedruppeltjes in het medium van een bioreactor kan helpen om de zuurstof verbruikt door de bacteriën in het medium, aan te vullen met zuurstof afkomstig uit de gasbellen.

Het principe hiervan, dat erop berust dat zuurstof veel beter oplost in olie dan in medium, werkt als volgt: oliedruppels bewegen zich naar het scheidingsvlak tussen gasbel en medium toe en zuigen zich hier vol met zuurstof, zie figuur 4. Deze volle oliedruppels verwijderen zich vervolgens van het grensvlak en geven de zuurstof dan weer af aan het medium, waarna deze cyclus zich weer herhaalt.

Met hulp van 'onze' octeendruppels bleek het 'aanvullen' van zuurstof, verdwenen uit het medium, maar liefst tot drie keer sneller te gaan.

Hoe groot de versnelling precies is, hangt niet alleen af van de oplosbaarheid en diffusiecoëfficiënt van zuurstof in de olie, het aantal druppels en de affiniteit van de druppels voor de gasbellen, maar ook in belangrijke mate van de druppelgrootte.

Met dit laatste hielden de bestaande modellen om de versnelling te voorspellen, nog geen rekening. Een nieuw model, door ons ontwikkeld, doet dit wel en beschrijft daarom naast onze metingen ook metingen van andere mensen (met andere druppels) vrij nauwkeurig.